

Figure 2. Effect of FR167653 on TNF- α expression in sera after intravenous injection of bleomycin. The saline+vehicle group was pretreated with 0.5% methylcellulose as a vehicle 2 h before a single intravenous (i.v.) injection of saline. The BLM+vehicle group was pretreated with the vehicle 2 h before a single i.v. injection of bleomycin (100 U/kg BW). The BLM+FR167653 group was pretreated with 50, 100, and 150 mg/kg BW FR167653 2 h before a single i.v. injection of bleomycin (100 U/kg BW). Two hours after i.v. injection of saline or bleomycin, bloods were obtained from the right ventricles. Bars denote the mean \pm SE of the serum TNF- α concentration (pg/ml) of each experimental group. The p values as compared with the value of the BLM+vehicle group are described as * p < 0.01.

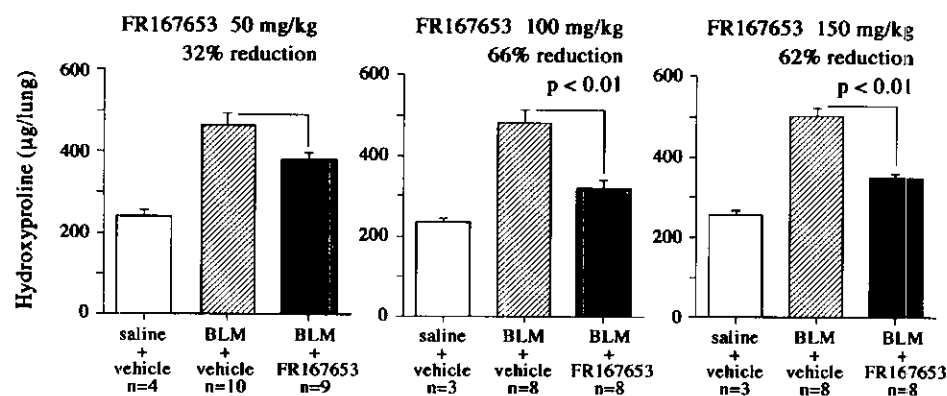


Figure 3. Effect of FR167653 on hydroxyproline (HOP) contents of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Hydroxyproline contents in whole lungs on Day 21 were estimated as described in Methods. Open bars: the saline+vehicle group (saline i.t. on Day 0, vehicle s.c. on Day -1 ~ Day 14), hatched bars: the BLM+vehicle group (bleomycin 0.8 U/kg BW i.t. on Day 0, vehicle s.c. on Day -1 ~ Day 14), closed bars: the BLM+FR167653 group (bleomycin 0.8 U/kg BW i.t. on Day 0, FR167653 50 mg/kg BW (the left panel), 100 mg/kg BW (the center panel), and 150 mg/kg BW (the right panel) s.c. on Day -1 ~ Day 14). % reduction = (HOP of the BLM+vehicle group - HOP of the BLM+FR167653 group) / (HOP of the BLM+vehicle group - HOP of the saline+vehicle group). Values are the means \pm SE.

減した (Figure 7).

考案・結論

ストレスキナーゼと称される p38 MAPK は様々な細胞外の刺激により活性化され、炎症性サイトカインの発現の重要な経路として知られ、アポトーシスにも関与している。p38 MAPK の上流として TGF- β activated kinase 1 も報告されており、TGF- β の刺激を Smad と共に核内へ伝達するという報告もなされている。様々なサイトカインやケモカインの発現や細胞内シグナル伝達において p38 MAPK が主要な役割を担っていることを示す報告は近年多数なされている。また、*in vivo* のモデルにおいても、p38 MAPK 阻害剤を用いてその効果が報告されている。関節炎モデル、DIC モデル、endotoxin shock モデル、Helicobacter pylori 胃炎、腎炎モデルなどにおいてである。一方、現在まで、肺線維症において細胞内シグナルの動態をみたものとしては、NF- κ B など二、三の報告があるのみである。そこで、肺線維症のモデルとして、マウスブレオマイシン肺線維症モデルを用い、その形成における p38 MAPK の関与について検討した。また、p38 MAPK 阻害剤 (FR167653) が肺線維症の治療薬となりうるかを検討した。

今回、ブレオマイシン暴露によっても BALF 細胞の p38 MAPK が活性化され、ATF-2 のリン酸化に至ることが示された^{8,9)}。ATF-2 のリン酸化は FR167653 によって抑制され、*ex vivo* でも FR167653 の効果が示された。また、静注モデルにおいて、ブレオマイシン投与 2 時間後に血清中 TNF- α の上昇を認め、これは FR167653 の前処置により基礎値まで復した。ヒトにおいてブレオマイシン投与により血中 TNF- α の上昇が報告されていた¹⁰⁾ が、p38 MAPK が TNF- α 発現のシグ

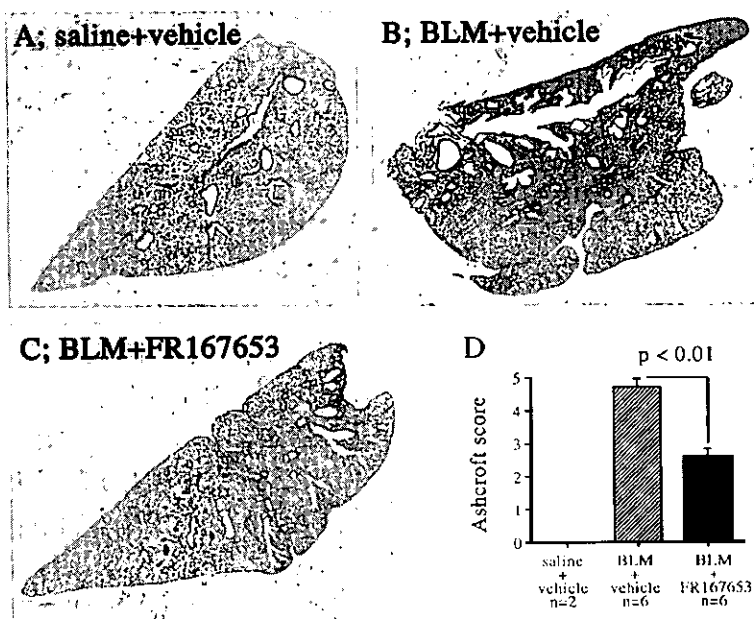


Figure 4. Effect of FR167653 on histopathologic changes of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Mice were treated as described in Figure 3. The lungs of the mice on Day 21 were fixed in 10% formaldehyde, routinely processed and stained with hematoxylin-eosin. A: the saline+vehicle group (saline i.t. on Day 0, vehicle s.c. on Day -1 ~ Day 14). B: the BLM+vehicle group (bleomycin 0.8 U/kg BW i.t. on Day 0, vehicle s.c. on Day -1 ~ Day 14). C: the BLM+FR167653 group (bleomycin 0.8 U/kg BW i.t. on Day 0, FR167653 150 mg/kg BW s.c. on Day -1 ~ Day 14). The left lungs are shown in the panels. Original magnification: $\times 4$. The lung sections of the BLM+vehicle group show marked histopathologic changes, such as large fibrous areas, collapsed alveolar spaces and traction bronchiectasis (B). However, in the lungs from the BLM+FR167653 group (C), fibrotic lesions are observed in the peribronchial area, but its extent is limited and its intensity is attenuated compared with the vehicle-treated mice. D: Evaluation of fibrotic changes on Day 21 in the lung by numerical fibrotic score (Ashcroft score). Bars denote Ashcroft scores (means \pm SE) of each experimental group.

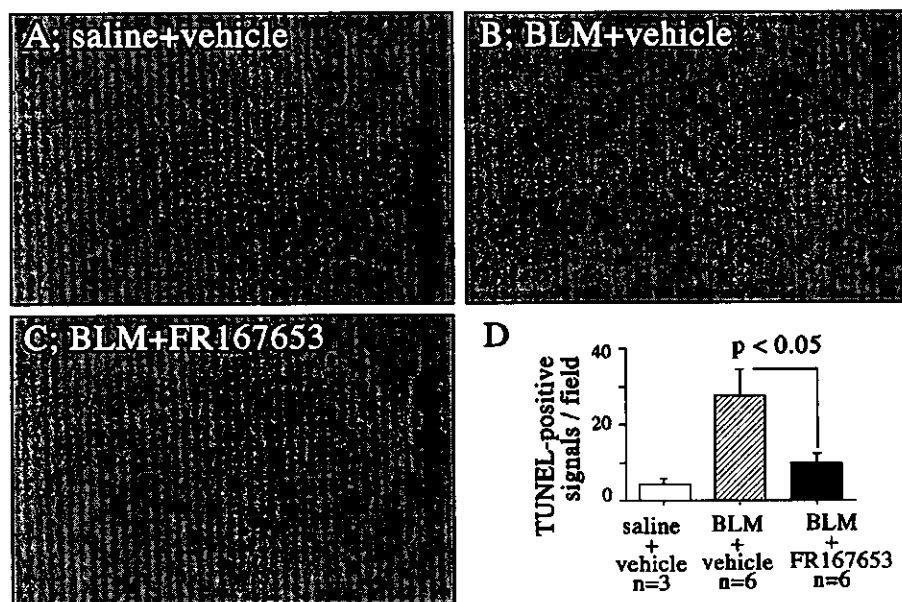


Figure 5. TUNEL analysis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. The lungs of the mice on Day 9 of bleomycin-induced pulmonary fibrosis were fixed in 10% formaldehyde, routinely processed and performed TUNEL staining. A: the saline+vehicle group (saline i.t. on Day 0, vehicle s.c. on Day -1 ~ Day 8). B: the BLM+vehicle group (bleomycin 0.8 U/kg BW i.t. on Day 0, vehicle s.c. on Day -1 ~ Day 8). C: the BLM+FR167653 group (bleomycin 0.8 U/kg BW i.t. on Day 0, FR167653 150 mg/kg BW s.c. on Day -1 ~ Day 8). TUNEL demonstrates few positive signals in the sections of the saline+vehicle group (A). In the BLM+vehicle group (B), the number of positive signals is increased significantly. The increase in the number of the positive signals is significantly reduced by treatment with FR167653 (C). Original magnification: $\times 100$. D: The numbers of the positive signals in the sections of each group were counted at magnification of $\times 100$. Bars denote the number of TUNEL-positive signals (means \pm SE) of each experimental group.

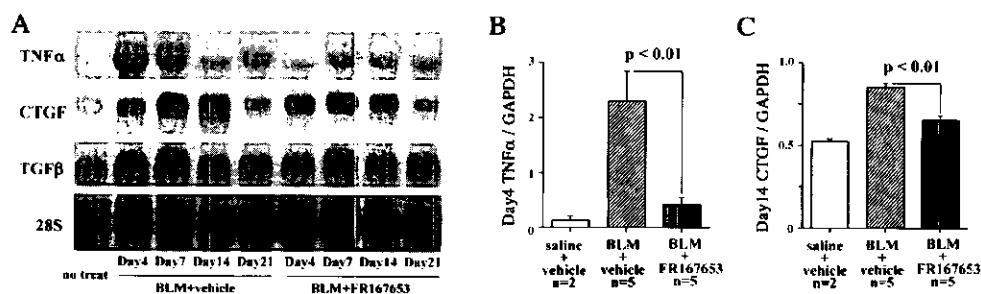


Figure 6. Effect of FR167653 on TNF- α , mCTGF, and TGF- β mRNA expressions of the whole lungs of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **A:** Northern blot analysis of mRNA of the whole lungs in the BLM+vehicle and the BLM+FR167653 groups harvested on Days 4, 7, 14, and 21. Mice were administered 0.8 U/kg BW of bleomycin i.t. on Day 0 and s.c. with vehicle (the BLM+vehicle group) or 150 mg/kg BW of FR167653 (the BLM+FR167653 group) from Day -1 until sacrifice (the sample marked Day 21 was harvested from the mouse treated with vehicle or FR167653 from Day -1 to Day 14). TNF- α , mCTGF, and TGF- β mRNA expressions of the saline+vehicle group on Day 4 had the same intensity with the non-treated mouse (data not shown). **B:** Quantification of TNF- α mRNA of the whole lung harvested on Day 4. Bars denote the ratio of TNF- α / GAPDH mRNA (means \pm SE) of each experimental group (open bar: the saline+vehicle group (saline i.t. on Day 0, vehicle s.c. on Day -1 ~ Day 3), hatched bar: the BLM+vehicle group (bleomycin 0.8 U/kg BW i.t. on Day 0, vehicle s.c. on Day -1 ~ Day 3), and closed bar: the BLM+FR167653 group (bleomycin 0.8 U/kg BW i.t. on Day 0, FR167653 150 mg/kg BW s.c. on Day -1 ~ Day 3)). **C:** Quantification of CTGF mRNA of the whole lung harvested on Day 14. Bars denote the ratio of CTGF / GAPDH mRNA (means \pm SE) of each experimental group (open bar: the saline+vehicle group (saline i.t. on Day 0, vehicle s.c. on Day -1 ~ Day 13), hatched bar: the BLM+vehicle group (bleomycin 0.8 U/kg BW i.t. on Day 0, vehicle s.c. on Day -1 ~ Day 13), and closed bar: the BLM+FR167653 group (bleomycin 0.8 U/kg BW i.t. on Day 0, FR167653 150 mg/kg BW s.c. on Day -1 ~ Day 13)).

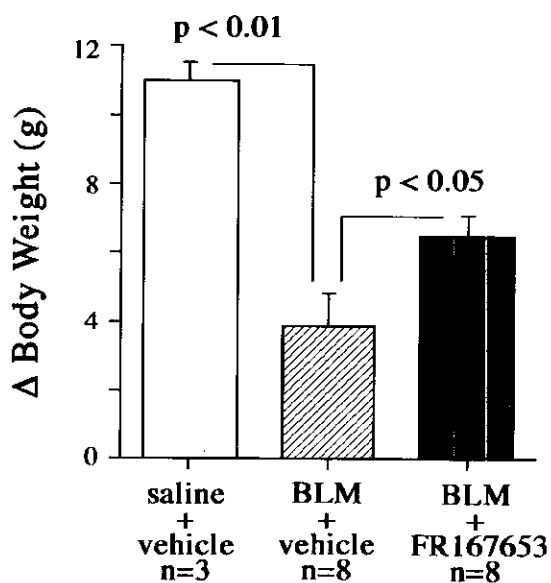


Figure 7. Effect of FR167653 on the weight gain during the time course of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. The mice were weighed on Day 0 and Day 21. Bars denote the increase in body weight (means \pm SE) of each experimental group. Open bar: the saline+vehicle group (saline i.t. on Day 0, vehicle s.c. on Day -1 ~ Day 14), hatched bar: the BLM+vehicle group (bleomycin 0.8 U/kg BW i.t. on Day 0, vehicle s.c. on Day -1 ~ Day 14), closed bar: the BLM+FR167653 group (bleomycin 0.8 U/kg BW i.t. on Day 0, FR167653 150 mg/kg BW s.c. on Day -1 ~ Day 14)

ナル伝達の主要な役割を担うことが示された。

ブレオマイシン気管内投与により全肺において、mRNA レベルで4日目と7日目にTNF- α の発現のピークをみたが、FR167653投与により減弱した。

ブレオマイシン肺線維症におけるTNF- α の発現にp38 MAPKが重要であることが示された。さらに、向線維化サイトカインとして、TGF- β とCTGFのmRNAの発現を経時的にみた^{11,12)}。14日目のCTGFはFR167653により抑制されたが、TGF- β は抑制されなかった。TGF- β に関しては、post-translationalな活性化がmRNA量よりも重要であることが多数報告されている¹³⁻¹⁵⁾。CTGFの発現促進因子としては、現在のところ、TGF- β のみが報告されている¹⁶⁾ので、今回、CTGFの発現が低下したのはTGF- β の活性低下によるのかもしれない。

FR167653投与により21日目の肺内ヒドロキシプロリン量の減少が見られたが、100 mg/kg BWと150 mg/kg BWで線維化抑制の効果は変わらず、約60%の部分抑制であった。これはp38 MAPK以外にもブレオマイシン肺線維症の形成に関与するシグナル伝達経路が存することが示唆される。他の経路についてもさらなる解析を必要とする。

ブレオマイシンを含めた肺線維症において、気管支及び肺胞上皮細胞のアポトーシスがみられ、その病態形成に重要であることが報告されている¹⁷⁻¹⁹⁾。本研究でも、ブレオマイシン投与9日後の肺組織のTUNEL染色では、TUNEL-positive細胞の個数に対するFR167653の抑制効果を見た。p38 MAPKのアポトーシスへの関与は種々の細胞種によって様々であり、肺胞上皮のアポトーシスにp38

MAPKが如何に関与しているかはさらなる検討が必要であるが、今回の結果は Fas ligand や TNF- α といった death signal の発現を FR167653 が抑制したことによる可能性がある。

肺線維症治療薬としての FR167653 の投与により、ブレオマイシン肺線維症に伴う体重増加不良を軽減した。これは肺の線維化によって起こる pulmonary cachexia に対する効果ではないかと推測する。

ブレオマイシン肺線維症の形成において p38 MAPK が重要な役割を演じていることが示された。p38 MAPK 阻害剤の線維化に対する効果の機序のさらなる解明が、肺線維化の病態の解明に寄与すると考えられる。また、肺線維症における p38 MAPK 以外の細胞内シグナルの研究も必要であると考えられる。

参考文献

- 1) Zhang Y, Lee TC, Guillemin B, Yu MC, and Rom WN. Enhanced IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure. *J Immunol* 1993; 150: 4188-4196.
- 2) Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Kapanci Y, and Vassalli P. Tumor necrosis factor/cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis. *J Exp Med* 1989; 170: 655-663.
- 3) Ortiz LA, Lasky J, Lungarella G, Cavarra E, Martorana P, Banks WA, Peschon JJ, Schmidts HL, Brody AR, and Friedman M. Upregulation of the p75 but not the p55 TNF- α receptor mRNA after silica and bleomycin exposure and protection from lung injury in double receptor knockout mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 825-833.
- 4) Ortiz LA, Lasky J, Hamilton RF, Holian A, Hoyle GW, Banks W, Peschon JJ, Brody AR, Lungarella G, and Friedman M. Expression of TNF and the necessity of TNF receptors in bleomycin-induced lung injury in mice. *Exp Lung Res* 1998; 24: 721-743.
- 5) Piguet PF, Vesin C, Grau GE, and Thompson RC. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) prevents or cures pulmonary fibrosis elicited in mice by bleomycin or silica. *Cytokine* 1993; 5: 57-61.
- 6) Yamamoto N, Sakai F, Yamazaki H, Sato N, Nakahara K, and Okuhara M. FR167653, a dual inhibitor of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha, ameliorates endotoxin-induced shock. *Eur J Pharmacol* 1997; 327: 169-174.
- 7) Takahashi S, Keto Y, Fujita T, Uchiyama T, and Yamamoto A. FR167653, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, prevents *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296: 48-56.
- 8) Ardeshtna KM, Pizzey AR, Devereux S, and Khwaja A. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF- κ B signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2000; 96: 1039-1046.
- 9) Cao W, Medvedev AV, Daniel KW, and Collins S. β -adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 27077-27082.
- 10) Sleijfer S, Vujaskovic Z, Limburg PC, Schraffordt Koops H, and Mulder NH. Induction of tumor necrosis factor-alpha as a cause of bleomycin-related toxicity. *Cancer* 1998; 82: 970-974.
- 11) Lasky JA, Ortiz LA, Tonthat B, Hoyle GW, Corti M, Athas G, Lungarella G, Brody A, and Friedman M. Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol* 1998; 275: L365-L371.
- 12) Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, and Grotendorst GR. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J* 1999; 13: 1774-1786.
- 13) Nakao A, Fujii M, Matsumura R, Kumano K, Saito Y, Miyazono K, and Iwamoto I. Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Clin Invest* 1999; 104: 5-11.
- 14) Border WA, and Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994:

- 331: 1286-1292.
- 15) Giri SN, Hyde DM, and Hollinger MA. Effect of antibody to transforming growth factor beta on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. *Thorax* 1993; 48: 959-966.
- 16) Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, and Grotendorst GR. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 637-645.
- 17) Hagimoto N, Kuwano K, Nomoto Y, Kunitake R, and Hara N. Apoptosis and expression of Fas/Fas ligand mRNA in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16: 91-101.
- 18) Kuwano K, Hagimoto N, Kawasaki M, Yatomi T, Nakamura N, Nagata S, Suda T, Kunitake R, Maeyama T, Miyazaki H, and Hara N. Essential roles of the Fas-Fas ligand pathway in the development of pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1999; 104: 13-19.
- 19) Hagimoto N, Kuwano K, Miyazaki H, Kunitake R, Fujita M, Kawasaki M, Kaneko Y, and Hara N. Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 272-278.

肝細胞増殖因子発現プラスミドによる肺線維化抑制

海老名雅仁 渡辺 正樹 秋山 健一 清水川 稔
中村 晃 三木 誠 貫和 敏博*

肺線維症の分子病態に応じた新しい治療が求められている。我々はプレオマイシン肺の病態に対する肝細胞増殖因子(HGF)の治療効果を、HGFタンパクの投与と、アデノウイルスベクターを介した投与にて示してきた。しかし、これらの投与法はいずれも慢性炎症疾患である肺線維症に臨床応用する前に解決すべき問題点が少なくない。本研究では、C57BL/6を対象として、hHGF遺伝子発現プラスミドを単独で静注した場合の組織発現、抗炎症効果、抗線維化効果を検証し、さらに血流シンチグラフィーで臨床応用されているMAAにPEIを結合し、プラスミドの肺内導入をさらに高める試みを行った。プラスミドpCAGGS 10 μ gの静注による炎症サイトカイン中TNF- α 、IL-6の発現はPBS静注による時と変化がみられず、共に高値を示すアデノウイルスベクター投与と対照的であった。hHGF/pCAGGS 10 μ g静注による肺組織中のhHGF蛋白発現は、48時間後に最大となり5日目には消退した。第2日目の各臓器組織内でのhHGF蛋白を比較すると、肺(252 \pm 88.0pg/g tissue)よりもむしろ肝臓に高い発現を示した(544 \pm 174pg/g tissue)。プレオマイシン90 μ gを経鼻投与後21日目のヒドロキシプロリン産生量は、PBS投与群(n=10, 199.2 \pm 14.1 μ g)、pCAGGS 10 μ g投与群(n=7, 212.8 \pm 12.4 μ g)に比べて、HGF/pCAGGS 10 μ g投与群(n=10, 162.6 \pm 10.3 μ g)で有意に低かった。HGF発現プラスミド単独投与の場合は10 μ gが最も高値であったのに対し、MAA-PEIと結合させた群ではHGF発現プラスミド1 μ gによる場合が最も高発現が見られた。肺内HGF産生の期間に関しては、HGF発現プラスミド単独では第5日目には消退するのに対し、MAA-PEIを結合させると、HGF発現プラスミド1 μ gの量で、第5日にはまだ205 \pm 40.1pg/g tissue (n=6)のHGFの発現が肺内組織に見られ、第7日、第10日にもそれぞれ120 \pm 21.6pg/g tissue (n=6)、115 \pm 32.2pg/g tissue (n=6)の産生を認めた。また、組織内HGF産生はHGF発現プラスミド単独の場合にくらべ、MAA-PEIと結合させることで、肺での発現を増加し、肝臓での発現を有意に減少させた。また、脾臓、腎臓、心臓内での発現は認めなかった。MAA-PEIを付加したHGF発現プラスミドによる線維化抑制効果の検討では、MAA-PEI-hHGF-pCAGGS 1 μ gはhHGF-pCAGGS 10 μ g単独とほぼ同じ線維化抑制効果があることを示した。これらの結果は肺線維症に対するHGF遺伝子治療実施の可能性を示す。

Inhibitory effects on pulmonary fibrosis of hepatocyte growth factor expressing plasmid vector conjugated with MAA

Masahito Ebina, Masaki Watanabe, Kenichi Akiyama, Minoru Shimizukawa,
Akira Nakamura, Makoto Miki, Toshihiro Nukiwa

Institute of Development, Aging, and Cancer, Tohoku University

Hepatocyte growth factor (HGF) is a humoral mediator of epithelial-mesenchymal interactions, acting on a variety of epithelial cells as mitogen, motogen, and morphogen. Exogenous HGF acts as a hepatotrophic factor and an organotrophic factor during experimental injury. We have already reported that exogenous HGF protein works as a pulmotrophic factor *in vivo* and prevents the progression of bleomycin-induced lung injury. On the basis of these findings and in order to step up for the clinical application of HGF in the field of respiratory diseases, we examined the effect of lung regeneration by gene delivery of HGF using a plasmid expressing human HGF driven by CAG promoter. By intravenous administration of human HGF/pCAGGS to C57BL/6 mice with bleomycin-induced lung injury, hydroxyproline content in the lung was lower than that by administration of null plasmid. HGF also suppressed the expression of proinflammatory cytokines, TNF- α and IL-6. We also evaluated both safety and selectivity of gene transfer to pulmonary cells utilizing macro-aggregated albumin (MAA)-polyethylenimine (PEI) conjugate as a vector of plasmid DNA. These results indicate the availability of an effective gene therapy for pulmonary fibrosis by HGF gene transfer utilizing MAA-PEI conjugates.

はじめに

肺線維症の病態発生機序としては、種々の要因から肺胞上皮細胞が傷害を受け、アポトーシスを引き起こすことによって末梢肺胞の虚脱を生じ、結果として蜂巢肺が形成されることが考えられている。特発性肺線維症はその原因が特定できない疾患であり、その病理像を UIP に限定する新しいガイドライン¹⁾によると、従来よりもさらに予後の悪い疾患であることが示されている。症状を呈する前のより早い段階での臨床診断と、肺線維症の分子病態に基づいた、より効果的な治療の開発が望まれている。

私達は、肺線維症患者肺の線維化早期段階の肺胞壁において活発な毛細血管新生がおきているものの、線維化が亢進した病巣では肺胞毛細血管が消失することを示した²⁾。またマウスブレオマイシン肺に対して血管新生抑制剤 TNP-470 あるいは血流阻害剤 AC-7700 を投与すると、いずれも線維化を著しく亢進することも示した^{3,4)}。毛細血管内皮細胞は肺胞上皮細胞の増殖・分化にもかかわり、ガス交換能を有する肺胞構造を保つ上で重要な働きをしていること⁵⁾を考え合わせると、傷害肺が呼吸能を保つ為には、単に線維化を抑制するのみではなく、毛細血管内皮細胞の再生が不可欠であることが予想される。

肝細胞増殖因子 (HGF) の肺の線維化抑制効果は、肺線維症モデルであるマウスブレオマイシン肺に対して、HGF のタンパク投与⁶⁾ や、アデノウイルスベクターを用いた HGF 遺伝子の導入⁷⁾ によって示してきた。これらの線維化抑制効果は、線維化促進物質の阻害作用や肺胞上皮再生促進からなることを示したが、HGF がもつ強力な血管新生作用が明らかになり、肺胞毛細血管新生促進によることも十分に考えられる。しかし、HGF の臨床応用という観点からは、HGF タンパクの大量注入は経済的にも大きな負担となり、また、HGF 遺伝子発現ベクターとしてのアデノウイルスの投与は、新たな炎症を惹起する可能性もあって、肺線維症の患者への投与は臨床上極めて困難である。

本研究では HGF の新しい投与方法として、HGF 発現プラスミドをそのまま静脈投与することの安全性と、その線維化抑制効果を検討した。さらに、臨床的により効率良く肺組織に HGF を発現させる方法として、臨床検査の肺血流シンチグラフィーで使われている MAA に HGF 発現プラスミドを結合させることによって、肺胞毛細血管に送り届ける方法を開発し、肺線維症に対する遺伝子治療の臨床応用の可能性を探った。

対象と方法

HGF 遺伝子発現プラスミド

大阪大学中村教授から提供されたヒト HGF の cDNA を、大阪大学の宮崎教授から提供された CAG プロモーター支配下の発現ベクターである pCAGGS⁸⁾ に組み込み、ヒト HGF 発現プラスミドベクターを作成した (HGF/pCAGGS)。対照としては cDNA を組み込んでいないプラスミド (pCAGGS) を使用した。

アデノウイルスベクター

プラスミド DNA の起炎症作用をアデノウイルスベクターによるものと比較するために、外来性の挿入遺伝子を組み込んでいない非増殖性アデノウイルスベクター AdCMV-Null を用いた。

MAA-PEI および MAA-Tc によるパイロットスタディ

MAA-PEI はベイラー大学の Orson 博士の協力を受けて、ウイルス感染等がないことを確認し得たものを使用した。またプラスミドとの結合およびその確認は彼らの方法に準じた⁹⁾。

HGF および炎症性サイトカインの測定

プラスミド血管内投与の安全性を確認する目的で、アデノウイルスベクター (AdCMV-Null) 1×10^{10} particles, pCAGGS $10 \mu\text{g}$, MAA-PEI-pCAGGS $1 \mu\text{g}$ を C57BL/6 マウス (メス, 8-10 週齢) 各群 4 匹ずつ静注し、5 時間後の炎症性サイトカイン TNF- α IL-6 の血清中濃度を ELISA kit (R&D 社) で測定した。投与したヒト HGF 遺伝子の臓器内での発現量は、humanHGF ELISA kit (R&D 社) で測定した。

MAA の肺内分布の確認

MAA-Tc (ラングシンチ Tc-99m, 日本メジフィジックス株式会社) $60 \mu\text{l}$ を尾静脈より静脈内に注入し、経時的にピンホールコリメーターを装着した

ガンマカメラにて経時的に撮像した。

マウスブレオマイシン肺および HGF の投与方法

C57BL/6 マウス (メス, 8-10 週齢) にブレオマイシン 90 μ g を経鼻投与することによって, 肺線維症モデルを作成した。ブレオマイシン投与後第 1, 4, 7 日に HGF/pCAGGS 10 μ g または MAA-PEI-HGF/pCAGGS 1 μ g を尾静脈より 200 μ l PBS に溶解して静注投与した。対照群には同様に PBS または pCAGGS を投与した。ハイドロキシプロリンは第 21 日目の肺内量を測定した。炎症性サイトカイン TNF- α および IL-6 の肺組織中の濃度計測はブレオマイシン投与後第 1, 4 日にプラスミドを投与し, 第 7 日目に行った。

ハイドロキシプロリンの定量

ホルマリン固定した右肺を, アセトンに 6 時間浸した後, エーテルにて脱脂を行った。十分に乾燥した肺をすりつぶして, 6N の塩酸を用いて 115 $^{\circ}$ C で 16 時間の加水分解を行った。高速液体クロマトグラフィーにてハイドロキシプロリン含量を測定した。

統計学的検討

データは mean \pm SD で示した。異なる 2 群のデータを統計学的に比較するためには Mann-Whitney の U 検定を用い, 危険率 5% 以下を有意差があると判定した。

結果

プラスミド血管内投与の安全性

アデノウイルスベクター (AdCMV-Null) 1 \times 10¹⁰ pfu をマウス頸静脈静注後 5 時間後の, 血清中 TNF- α および IL-6 は著明に上昇した (n=4; TNF- α , 7.04 \pm 2.19pg/ml; IL-6, 589 \pm 112pg/ml)。それに対して pCAGGS 10 μ g の頸静脈静注後は PBS 静注による効果 (n=4, TNF- α , 0.01 \pm 0.02pg/ml, IL-6, 281 \pm 75.1pg/ml) と統計学的な差を認めなかった (n=4; TNF- α , 0.43 \pm 0.85pg/ml; IL-6, 239 \pm 53.3pg/ml) (図 1)。

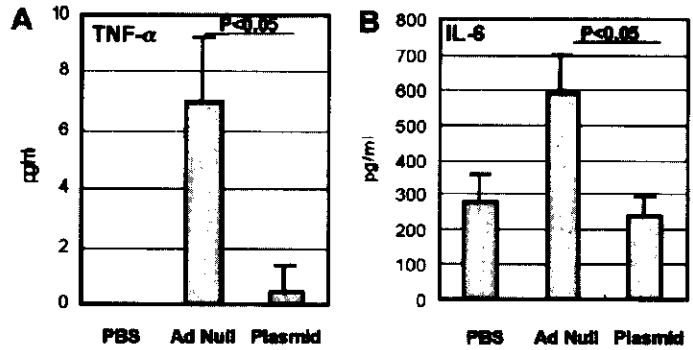


図 1 アデノウイルスベクターとプラスミド DNA による起炎効果の比較。PBS, アデノウイルスベクター (AdCMV-Null) 1 \times 10¹⁰ particles, pCAGGS 10 μ g, をそれぞれ 4 匹づつ静注し, 5 時間後の炎症性サイトカイン TNF- α , IL-6 の血清中濃度を比較した。どちらも著しく高くするアデノウイルスベクターに比し, プラスミド DNA の静注による起炎効果は PBS 静注と差を認めない。

血管内投与した HGF 遺伝子発現プラスミドの肺での発現量および経時変化

hHGF/pCAGGS 10 μ g 静注による肺組織中の hHGF 蛋白発現は, 12 時間後から認められ, 48 時間後に最大となり (n=5, 251.9 \pm 88.7pg/g tissue), 5 日目には消退した (図 2A)。第 2 日目の各臓器組織内での hHGF 蛋白を比較した結果 (図 2B), 肝臓にもっとも発現が高く (544 \pm 174pg/g tissue), 肺 (252 \pm 88.0pg/g tissue), 脾臓 (100 \pm 44.9pg/g tissue), 腎臓 (63.1 \pm 28.0pg/g tissue), 心臓 (27.3 \pm 12.2pg/g tissue) と続く。

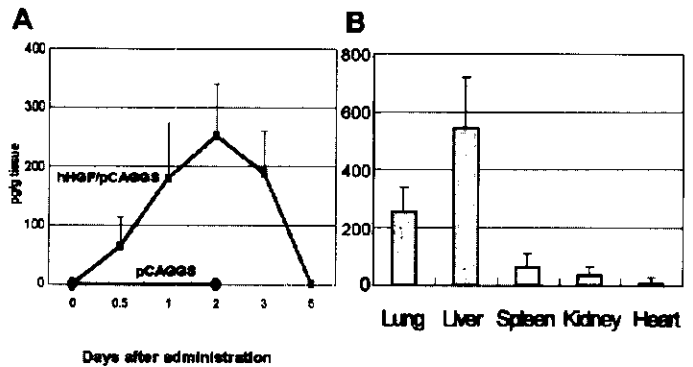


図 2 hHGF 発現プラスミドの発現効率。(A) HGF/pCAGGS 10 μ g 静注後の肺組織内 hHGF 蛋白量の変化。2 日目に最大となり, 5 日目には消退する。(B) HGF/pCAGGS 10 μ g 静注後 2 日目の各臓器組織内の hHGF 蛋白量。肺よりもむしろ肝臓に発現が高い。

HGF 遺伝子発現プラスミド投与による抗炎症効果および抗線維化効果

HGF 投与群は対照群と比べて、プレオマイシン投与後 7 日目の肺組織中 TNF- α 、IL-6 の発現を抑制していた。(HGF 投与群 n=7, TNF- α 13.22 \pm 2.40pg/g tissue, IL-6 616.4 \pm 74.6pg/g tissue, PBS 投与群 n=7, TNF- α 25.90 \pm 2.44pg/g tissue, IL-6 887.9 \pm 64.2pg/g tissue, pCAGGS 投与群 n=7, TNF- α 33.16 \pm 3.95pg/g tissue, IL-6 1093.6 \pm 186.2pg/g tissue) (図 3). IL-1b の発現には有意差を認めなかった。プレオマイシン投与後 21 日目のハイドロキシプロリン産生量は、PBS 投与群 (n=10, 199.2 \pm 14.1 μ g), pCAGGS 投与群 (n=7, 212.8 \pm 124 μ g) に比べて、HGF 投与群 (n=10, 162.6 \pm 10.3 μ g) で有意に低かった (図 8A)。

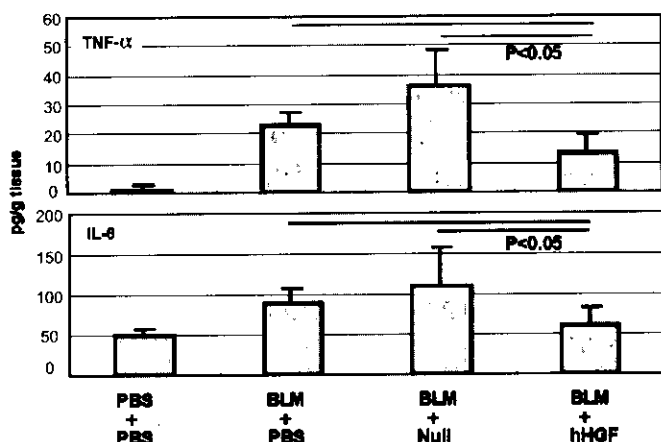


図 3 プレオマイシン中の炎症性サイトカインの変化。
プレオマイシン 90 μ g を経鼻投与行った後、第 1 日、第 4 日に PBS, Null plasmid, hHGF 発現 plasmid を投与、第 7 日目の単位重量あたりの肺組織中 TNF- α 、IL-6 を比較した。どちらのサイトカインもこの時点で抑制されている。

MAA-PEI 付加による発現効率の変化

MAA-Tc60 μ l を尾静脈より静脈内に注入し、経時的にピンホールコーリメーターを装着したガンマカメラにて撮像した。肺野には静注 5 分後にはとりこみが見られ始め、2 時間以上経過しても肺野に強いとりこみが確認された(図 4A)。この時点では肝臓を含む他臓器には、とりこみは認められない。

MAA と PEI の結合物の作成はオルソン博士らの協力による。この原理は PEI 表面がポジティブに荷電しており(図 4B)、マイナスに荷電しているプラスミドが多く付着可能になることに基づく。MAA-PEI に結合させる HGF 発現プラスミド (hHGF-pCAGGS) を 0, 0.5, 1, 5, 10 μ g として、静注投与

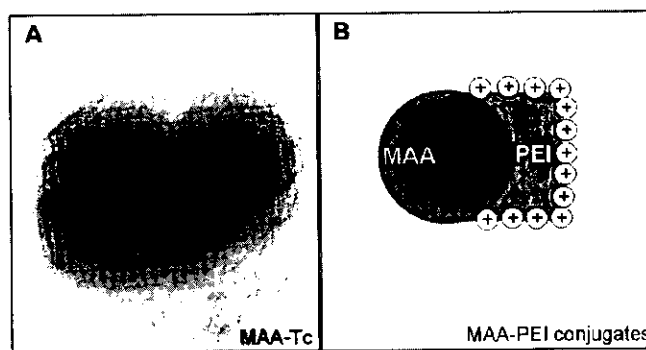


図 4 MAA の肺内へのとりこみと MAA-PEI 結合物。
(A) MAA-Tc をマウスに静注後 2 時間のガンマカメラ像。肺のみに強い取り込みが見られる。
(B) 表面がマイナスに荷電している PEI を MAA に結合することによって、プラスミドを MAA とともに肺内に滞留する時間を長くする。

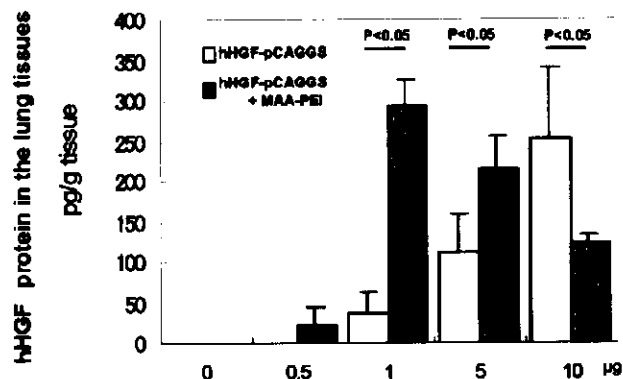


図 5 肺内 hHGF タンパクの発現
hHGF-pCAGGS 0-10 μ g に MAA-PEI と結合の有無による、静注後 2 時間後の肺内 hHGF タンパクの発現の差を比較した。MAA-PEI と結合させることで少ないプラスミド量で発現量を高められた。しかし、MAA-PEI に結合させるプラスミド量が 10 μ g になると、むしろプラスミド単独投与より低くなる。

後 2 時間の肺内 HGF 産生量を比較し (図 5)、図 2 に示した HGF 発現プラスミド単独投与群と比較した。その結果は HGF 発現プラスミド単独投与の場合は 10 μ g が最も高値であったのに対し、MAA-PEI と結合させた群では 1 μ g が最も高値であり (294 \pm 32.1pg/g tissue)、プラスミド単独投与よりも有意に高値である (38.6 \pm 23.6pg/g tissue, p<0.05)。5 μ g 投与でも MAA-PEI に結合させて投与したほうが、肺内発現量は高値であるが (214 \pm 42.7pg/g tissue vs. 109 \pm 48.9pg/g tissue)、10 μ g 投与ではむしろ MAA-PEI に結合させて投与したほうが、肺内発現量は低くなる (123 \pm 11.4pg/g tissue vs. 252 \pm 88.0pg/g tissue)。

MAA-PEI と結合した HGF 発現プラスミド 1 μ g を静注させた後の肺内 HGF 産生の変化を図 6 に示す。図 2A で示した様に HGF 発現プラスミド単独では

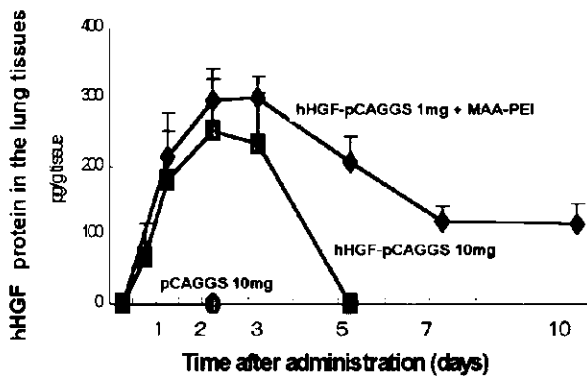


図6 肺内hHGFタンパクの発現の持続時間
hHGF-pCAGGS10 μ gとhHGF-pCAGGS1 μ gにMAA-PEIを結合させた場合の肺内hHGFタンパクの発現量を経時的に比較した。MAA-PEIと結合させることで発現時間は著明に延長される。

plasmid DNA 1 μ gでは234 \pm 21.8 μ g/g tissueのハイドロキシプロリンであるのに対し、MAA-PEI-hHGF-pCAGGS 1 μ gでは162 \pm 13.0 μ g/g tissueまで減少させている。この効果はhHGF-pCAGGS 10 μ g単独とほぼ同じ線維化抑制効果であることを示す。

考案・結論

アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入は、炎症を惹起することから、炎症性肺疾患である肺線維症の患者に対して臨床応用するには困難な点が少ないことが予想される。本研究でも、アデノウイルスベクターの静注によって、血清中のTNF- α およびIL-6のいずれも増加していることが示された。これに対し、プラスミドの単独投与ではどちらのサイトカインも上昇しない。プラスミドがアデノウイルスベクター投与よりも優れているもうひとつの特徴は繰り返し投与が可能であることである。一方、プラスミド単独投与がアデノウイルスベクターによる投与よりも決定的に劣る点は、その導入効率の低さにある。そこで、本研究のテーマはプラスミド単独で発現されたhHGFがどの程度、プレオマイシン肺に有効であるのか、という点と、肺での発現を強める工夫である。

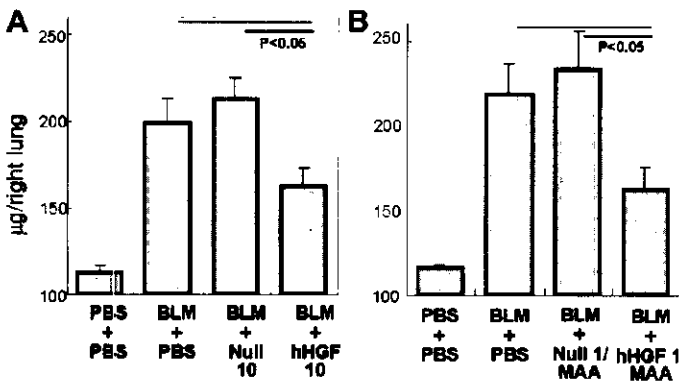


図7 プレオマイシン肺の右肺あたりのハイドロキシプロリン量
プレオマイシン投与後、第1, 4, 7日目にhHGF-pCAGGS 10 μ gあるいはhHGF-pCAGGS 1 μ gとMAA-PEIとの結合物を静注し、その第21日目の右肺あたりのハイドロキシプロリン量を示す。どちらも同程度の線維化抑制効果を示している。

第5日目には消退するのに対し、MAA-PEIを結語させると、HGF発現プラスミド1 μ gの量で、第5日にはまだ205 \pm 40.1pg/g tissue (n=6)のHGFの発現が肺内組織に見られ、第7日、第10日にもそれぞれ120 \pm 21.6pg/g tissue (n=6), 115 \pm 32.2pg/g tissue (n=6)の産生を認めた。

第2日目の組織内HGF産生を臓器別に調べた。HGF発現プラスミド単独の場合にくらべ(図2B)、MAA-PEIと結合させることで、肺での発現を増加し(n=5, 364 \pm 28.7pg/g tissue)、肝臓での発現を有意に減少させた(n=5, 287 \pm 23.4pg/g tissue)。また、脾臓、腎臓、心臓内での発現は認めなかった。

MAA-PEIを付加したHGF発現プラスミドによる線維化抑制効果の検討では、図8Bに示す様に、プレオマイシンによるハイドロキシプロリン産生を抑制した。すなわちプレオマイシン単独では219 \pm 17.4 μ g/g tissue、プレオマイシン+MAA-PEI-Null

hHGF発現プラスミド単独投与の実験結果からは、肺よりもむしろ肝でのHGF発現が顕著であることが示された。これは静注されたプラスミドが速やかに肺の毛細血管を通りぬけてしまったこと、おそらくはHGFの発現が肝臓でより効率よくなされている可能性が考えられる。本研究では、ヒトHGF/pCAGGS単独静注によって、プレオマイシンで惹起された炎症を抑制し、さらに線維化を抑制することが示されたが、この効果に肝臓で生成されたhHGFタンパクが影響している可能性は否定できない。いずれにせよ、プラスミド単独投与でも、プレオマイシンによる炎症・線維化が抑制されることが示された。

本研究ではさらに、MAA-PEIとプラスミドを結合させることによって、hHGFがより肺組織に特異的に発現させることが示された。その導入高率はプラスミド単独の10倍であり、肝臓を含め、他臓

器の発現を著明に減少させた。また、肺内での発現も、プラスミド単独では5日で消退するのに対し、10日後でもまだhHGFが発現していることが確認された。一般にMAAは分解され、速やかに尿中に排出されることから、この発現は、hHGF遺伝子が導入された細胞の存続を示すものと考えられる。

HGFには上皮再生や線維化抑制効果に加えて、強力な血管新生作用が示されていることから、肺胞毛細血管側からのアプローチが、肺の再生に大きな効果を与えている可能性が考えられる。今後はさらに導入された細胞の同定や、肺の再生にどの程度血管新生の効果が反映されているのかを解析していく必要がある。

参考文献

- 1) King TE, Costabel U, Cordier JF, DoPico GA, Du Bois RM, Lynch D, Lynch JP, III, Myers J, Panos R, Raghu G, Schwartz D, Smith CM. Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis and treatment. International consensus statement. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:646-664.
- 2) 海老名雅仁, 清水川稔, 猪岡 望, 阿部達也, 貫和敏博. 肺線維症における新生血管に関する研究. 厚生省特定疾患平成11年度びまん性肺疾患調査研究. 84-88, 1999.
- 3) 海老名雅仁, 清水川稔, 木林雄一郎, 秋山健一, 中村 晃, 三木 誠, 貫和敏博. 早期肺線維化病変における血管新生の病態への影響. 厚生省特定疾患 びまん性肺疾患調査研究班 平成12年度研究報告, 69-73, 2000.
- 4) 海老名雅仁, 渡辺正樹, 鯉沼代造, 清水川稔, 三木 誠, 貫和敏博. 肺線維化機序に関する血管新生の意義の解明. 厚生省特定疾患 びまん性肺疾患調査研究班 平成13年度研究報告, 2001.
- 5) Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest* 2000; 106: 1311-1319.
- 6) Yaekashiwa M, S Nakayama, K Onuma, T sakai T abe, K satoh, K matsumoto, T nakamura, T Takahashi and T nukiwa. Simultaneous or delayed administration of hepatocyte growth factor equally represses the fibrotic changes in murine lung injury induced by bleomycine. A morphologic study. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 1937-1944. 1997.
- 7) 三木誠, 秋山健一, 海老名雅仁, 渡辺正樹, 鯉沼代造, 萩原弘一, 中村 晃, 貫和敏博. HGFによる肺線維症遺伝子治療の臨床応用. 厚生省特定疾患 びまん性肺疾患調査研究班 平成13年度研究報告, 245-252, 2001.
- 8) Niwa H, K Yamamura, and Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eularyotic vector. *Gene* 108: 193-200, 1991.
- 9) Orson FM, Kinsey BM, Hua PJ, Bhogal BS, Densmore CL, Barry MA. Genetic immunization with lung-targeting macroaggregated polyethyleneimine-albumin conjugates elicits combined systemic and mucosal immune responses. *J Immunol* 164 (12) : 6313-21, 2000.

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Eishi Y, Suga M, Ishige I, Kobayashi D, Yamada T, Takizawa T, Koike M, Takemura T, Kudoh S, Costabel U, Guzman J, Rizzato G, Gambacorta M, du Bois R, Nicholson AG, Sharma Om P, Ando M.	Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes from Japanese and European patients with sarcoidosis	J Clin Microbiol	40 (1)	198-204	2002
Kobayashi D, Eishi Y, Ohkusa T, Ishige I, Suzuki T, Minami J, Yamada T, Takizawa T, Koike M	Gastric mucosal density of <i>Helicobacter pylori</i> estimated by real-time PCR compared with results of urea breath test and histological grading	J Med Microbiol	51	1-7	2002
Yamada T, Eishi Y, Ikeda S, Ishige I, Suzuki T, Takemura T, Takizawa T, Koike M	In situ localization of <i>Propionibacterium acnes</i> DNA in lymph nodes from sarcoidosis patients by signal amplification with catalysed reporter deposition	J Pathol			2002 (in submission).
Fujita H, Eishi Y, Ishige I, Saitoh K, Takizawa T, Arima T, Koike M	Quantitative analysis of bacterial DNA from <i>Mycobacteria</i> spp, <i>Bacteroides vulgatus</i> , and <i>Escherichia coli</i> in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases	J Gastroenterol			2002 (in press)
Kawachi H, Takizawa T, Eishi Y, Shimizu S, Kumagai J, Funata N, Koike M	Absence of either gastric or intestinal phenotype in microscopic differentiated gastric carcinomas	J Pathol			2002 (in submission)
Ohkusa T, Fujiki K, Takashimizu I, Kumagai J, Tanizawa T, Eishi Y, Yokoyama T, Watanabe M	Improvement in atrophic gastritis and intestinal metaplasia in patients in whom <i>Helicobacter pylori</i> was eradicated	Ann Intern Med	134 (5)	380-6	2001
Akashi T, Ito E, Eishi Y, Koike M, Nakamura K, Burgeson RE	Reduced Expression of Laminin alpha 3 and alpha 5 Chains in Non-small Cell Lung Cancers	Jpn J Cancer Res	92 (3)	293-301	2001
Ikeda S, Shibata T, Kimura H, Eishi Y	The expression of telomerase reverse transcriptase protein is associated with p53 expression or high Ki-67 labeling index or both in advanced colorectal cancer	Jpn J Cancer Clin	47 (1)	117-121	2001
Mimura M, Tanaka N, Kimijima Y, Eishi Y, Amagasa T, Okada N	Melanotic neuroectodermal tumor of infancy -immunohistochemical and ultrastructural study-	Asian J Oral Maxillofac Surg	12	217-224	2000
Ebe Y, Ikushima S, Yamaguchi T, Kohno K, Azuma A, Sato K, Ishige I, Usui Y, Takemura T, Eishi Y	Proliferative response of peripheral blood mononuclear cells and levels of antibody to recombinant protein from <i>Propionibacterium acnes</i> DNA expression library in Japanese patients with sarcoidosis	Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis	17	256-265	2000
Ohkusa T, Fujiki K, Takashimizu I, Kumagai J, Tanizawa T, Eishi Y	Endoscopic and histological comparison of nonulcer dyspepsia with and without <i>Helicobacter pylori</i> infection evaluated by the modified Sydney system	Am J Gastroenterol	95	2195-2199	2000

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Kato C, Sato K, Wakabayashi A, Eishi Y	The effects of allopurinol on immune function in normal BALB/c and SCID mice	Int J Immunopharmacol	22	547-556	2000
Ariake K, Ohkusa T, Sakurazawa T, Kumagai J, Eishi Y, Hoshi S, Yajima T	Roles of mucosal bacteria and succinic acid in colitis caused by dextran sulfate sodium in mice	J Med Dent Sci	47	233-241	2000
Tanaka M, Kawaguchi Y, Yokofujita J, Takagi M, Eishi Y, Hirai K	Sequence variations of Epstein-Barr virus LMP2A gene in gastric carcinoma in Japan	Virus Genes	19	103-111	1999
Kato C, Sato K, Eishi Y, Nakamura K.	The influence of initial exposure timing to beta-lactoglobulin on oral tolerance induction. J Allergy Clin Immunol	104	870-878	1999	
Ishige I, Usui Y, Takemura T, Eishi Y.	Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis.	Lancet	354	120-123	1999
Eishi Y, Ishige I, Usui Y, Ebe Y, Takemura T.	Propionibacteria as a possible causative agent of sarcoidosis.	Sarcoidosis Vase Diffuse Lung Dis	16	8-10	1999
Akashi T, Miyagi T, Ando N, Suzuki Y, Nemoto T, Eishi Y, Nakamura K, Shirasawa T, Osa N, Nanaka N, Burgeson RE.	Synthesis of basement membrane by gastrointestinal cancer cell lines.	J Pathol	187	223-228	1999
Sakamoto O, Suga M, Suda T, Ando M.	Expression of discoidin domain receptor 1 throsine kinase on the human bronchial epithelium.	Eur Respir J 17	5	969-974	2001
Takahashi T, Suga M, Matsukawa A, Sato K, Okamoto T, Ohkawara S, Yoshinaga M, and Ando M.	Erythromycin attenuates an experimental model of chronic bronchiolitis via augmenting MCP-1.	Eur Respir J 17	3	360-367	2001
Sakamoto O, Suga M, Suda T, Ando M.	Expression of discoidin domain receptor 1 throsine kinase on the human bronchial epithelium.	Eur Respir J 17	5	969-974	2001
Ichiyasu H, Suga M, Iyonaga K, Ando M.	Role of monocyte chemoattractant protein-1 in Propionibacterium acnes- induced pulmonary granulomatosis.	Microsc Res Tech	53 (4)	288-297	2001
Kishi, H. Nakagawa, K. Matsumoto, M. Suga, M. Ando, M. Taya, Y. Yamaizumi, M.	Osmotic Shock Induces G1 Arrest through p53 Phosphorylation at Ser33 by Activated p38MAPK without Phosphorylation at Ser15 and Ser20.	J Biol Chem	276 (42)	39115-39122	2001
Gushima Y, Ichikado K, Suga M, Okamoto T, Iyonaga K, Miyakawa H, and Ando M.	Expression of matrix metalloproteinases in pigs with hyperoxia-induced acute lung injury	Eur Respir J	18 (5)	827-837	2001
Miyakawa H, Sato K, Shinbori T, Gushima Y, Fujiki M, and Suga M.	Effects of iNOS and xanthine oxidase inhibitors in interstitial pneumonia induced by superantigen.	Eur Respir J	19 (3)	447-57	2002
Eishi Y, Suga M, Ishige I, Kobayashi D, Yamada T, Takizawa T, Koike M, Takemura T, Kudoh S, Costabel U, Guzman J, Rizzato G, Gambacorta M, du Bois R, Nicholson AG, Sharma OP, Ando M.	Quantitative analysis of propionibacterial and mycobacterial DNA in lymphnodes of Japanese and European patients with sarcoidosis.	J Clin Microbiol	40 (1)	198-204	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Takano Y, Sakamoto O, Suga M, muranaka H, and Ando M.	Prognostic factors of nosocomial pneumonia in general wards: a prospective multivariate analysis in Japan.	Respir Med	96 (1)	18-23	2002
Ichikado K, Suga M, Nestor L. Moler, Hiroyuki Taniguchi, Yasuhiro Kondoh, Masanori Akira, Takeshi Johkoh, Naoki Mihara, Hironobu Nakamura, Mutsumasa Takahashi, Masayuki Ando.	Acute interstitial pneumonia: comparison of high-resolution computed tomography findings between survivors and nonsurvivors.	Am J Respir Crit Care Med	165	1551-1556	2002
菅 守隆	過敏性肺炎	内科	87 (3)	447-450	2001
菅 守隆	肺線維症とサイトカイン	臨床免疫	35	702-709	2001
菅 守隆	間質性肺炎	最新老年呼吸器病学(福地義之助編)永井書店	p434-445	2001	
菅 守隆	過敏性肺炎	EBMのためのデータブック 臨床医	27	97-101	2001
菅 守隆	過敏性肺炎. 呼吸器疾患の最新の治療-2001-2003-	(工藤翔二, 中出紘一郎, 貫和敏博 編) 南江堂	p306-308	2001	
一安秀範, 菅 守隆	P. acnes 誘発肺肉芽腫モデルにおける Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の役割	日サ会誌	21	3-11	2001
菅 守隆, 一安秀範	Propionibacterium acnes & granulorum の病因的意義と課題.	最新医学	56	2563-2568	2001
菅 守隆	過敏性肺炎	呼吸器疾患の治療と看護(工藤翔二編)	南江堂	p277-279	2002
菅 守隆	過敏性肺炎	日常診療の手引き-呼吸器疾患-(清水喜八郎, 松島敏春, 佐々木英忠, 永井厚志 編)		p121-128	2002
菅 守隆	特発性間質性肺炎の新しい分類と診断	呼吸器科	1	35-44	2002
菅 守隆	サルコイドーシスと鑑別すべき疾患: 過敏性肺炎. 新しい診断と治療	最新医学		p110-116	2002
菅 守隆	特発性間質性肺炎の診断の進め方	呼吸器科	1	451-460	2002
菅 守隆	特発性間質性肺炎の診断の進め方-特発性肺線維症-を中心に	日本医師会雑誌	128	208-212	2002
Inoue Y, King TE, Barker E, Daniloff E, Newman LS.	Basic Fibroblast Growth Factor and Its Receptors in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Lymphangiomyomatosis.	Am J Resp Crit Care Med			in press
Ueno K, Inoue Y, Kawaguchi T, Hosoe S, Kawahara M.	Increased serum levels of basic fibroblast growth factor in lung cancer patients: relevance to response of therapy and prognosis.	Lung Cancer	31	213-219	2001
Inoue K, Inoue Y, Arai T, Nawa Y, Kashiwa Y, Yamamoto S, Sakatani M.	Chronic eosinophilic pneumonia due to visceral larva migrans.	Internal Medicine			in press

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Okada M, Tanaka T, Inoue Y, Yoshida S, Ohara N, Yamada T, Matsumoto M, Sakatani M and Mori T	New (DNA- Recombinant BCG- and Subunit-) Vaccination against tuberculosis and cytotoxic activity.	research conference on tuberculosis and leprosy	36	127-133	2001
Hamada H, Vallyathan V, Cool CD, Barker E, Inoue Y, Newman LS.	Mast cell basic fibroblast growth factor in silicosis	Am J Respir Crit Care Med.	161	2026-2034	2000
Iwasaki T, Nakashima M, Watanabe T, Yamamoto S, Inoue Y, Yamanaka H, Matsumura A, Iuchi K, Mori T, Okada M.	Expression and prognostic significance in lung cancer of human tumor-associated antigen RCAS1	Int. J. Cancer(Pred. Oncol.)	89	488-493	2000
Akira M, Inoue Y, Yamamoto S, Sakatani M.	Non-specific interstitial pneumonia : findings on sequential CT scans of nine patients	Thorax	55 (10)	854-859	2000
Kitamura T, Uchida K, Tanaka N, Tsuchiya T, Watanabe J, Yamada Y, Hanaoka K, Seymour JF, Schoch OD, Doyle I, Inoue Y, Sakatani M, Kudoh S, Azuma A, Nukiwa T, Kanegasaki S, Nakata K.	Serological diagnosis of idiopathic pulmonary alveolar proteinosis	Am J Respir Crit Care Med	162	658-662	2000
Inoue Y, Kawaguchi T, Yoshida A, Harada H, Hara H, Yamamoto S, Sakatani M.	Paragonimiasis miyazakii associated with bilateral pseudochylothorax	Internal Medicine	39 (7)	579-582	2000
M. Okada, Tanaka T., Inoue Y., Katayama Y., Yoshida S., Ohara N., Yamada T., Kayagaki N., Yagita H., Okumura K. Sakatani M. and Mori T.	DNA and recombinant BCG vaccination against tuberculosis and cytotoxic activity in the patients with multi-drug resistant tuberculosis	research conference on tuberculosis and leprosy	35	p. 197-201	2000
Kawaguchi T, Matumura A, Iuchi K, Yamamoto S, Inoue Y, Sunami T, Naka N, Okishio K, Ueno K, Atagi S, Ogawara M, Hosoe S, Kawahara M.	Solitary squamous papilloma of the bronchus associated with human papilloma virus type II	Internal Medicine	38	817-819	1999
川口知哉, 延山誠一, 光岡茂樹, 須波敏彦, 中宜敬, 沖塩協一, 上野清伸, 安宅信二, 井上義一, 小河原光正, 細江重人, 四元正一, 河原正明, 井内敬二, 山本暁, 古瀬清行	種々の内科的治療を試みた気管原発腺様嚢胞癌の一部検討	日本呼吸器学会雑誌	38	812-816	2000
井上義一, 坂谷光則.	間質性肺炎 肺線維症のADLとQOL	THE LUNG	8 (4)	456-461	2000
井上義一, 坂谷光則.	肺外結核	Medical Practice	17 (6)	969-973	2000
井上義一, 山本暁, 岡田全司, 坂谷光則	肺の線維化とマスト細胞由来 basic fibroblast growth factor	黒沢元博編:肥満細胞の臨床.先端医学社		p135-p141	2001
井上義一	特発性肺線維症	新しい診断と治療のABC3/呼吸器3 サルコイドーシス, 泉孝英編	最新医学社	p125-p135	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
J Nakano, M Tajima, M Murata, Y Nakajima, M Kuwabara, M Kitada, T Miyasaka, H Arioka, N Yamashita, K Ohta.	Antisense DNA of platelet derived growth factor (PDGF) suppresses murine pulmonary fibrosis with silica particles.	Am J Respir Critical Care Med	159	71	1999
Doherty DE, Nakano J, Nakano K.	Neutrophil-derived heparin-binding protein: a monocyte-specific chemoattractant that induces monocyte migration into rabbit lungs in vivo.	Chest	116 (1)	34-35	1999
J Nakano, Y Nakajima, M Tajima, N Yamashita, K Ohta, et al	Aminophylline but not salbutamol could modulate the mediator release in acute exacerbation of asthma	Am J Respir Critical Care Med	159	642	1999
Ohta K, Nakano J, Miyamoto T, et al	Diesel exhaust particulate induces airway hyper-responsiveness in a murine model: Essential role of GM-CSF	J Allergy Clin Immunol	104	1024-30	1999
J Nakano, K Nakangome, M Tajima, M Murata, Y Nakajima, K Yamada, H. Arioka, M Kuwabara, M Kitada, K Ohta.	Trapidil inhibits the developing of pulmonary fibrosis in mice with silica particles	Am J Respir Critical Care Med	157	278	1998
Ohta K, Nakano J, Kaneda M, et al	Suppressive effect of antisense DNA of platelet derived growth factor (PDGF) on murine pulmonary fibrosis with silica particles	Chest	111	105s	1997
Nakano J, Ohta K, Nakajima Y, et al	Theophylline has an anti-inflammatory effect via inhibition of the release of eosinophil cationic protein (ECP) in the management of asthma	Am J Respir Crit Care Med	155	660	1997
H Takizawa, T Ohtoshi, J Nakano, et al	Erythromycin (EM) Suppress Endothelin I (ET-1) Expression by Human Bronchial Epithelial Cells	Am J Respir Crit Care Med	151	833	1995
Ohta K, Yamashita N.	Apoptosis of eosinophils and lymphocytes in allergic inflammation	J Allergy Clin Immunol	104 (1)	14-21	1999 Jul
Ohta K, Sawamoto S, Kubota S, et al	The prolonged survival of human eosinophils with interleukin-5 and its inhibition by theophyllin via apoptosis	Clin Exp Allergy	26 (2)	10-15	1996
Yamaguchi M, Hirai K, Ohta K, et al	Nonreleasing basophils convert to releasing basophils by culturing with interleukin 3	J Allergy Clin Immunol	97 (6)	1279-1287	1996
Suzuki N, Ohta K, et al	T-lymphocytes and silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. 1. Nude athymic mutants protect against fibrosis	Thorax	51	1036-1042	1996
Miyamasu M, Hirai K, Takahashi Y, Iida M, Yamaguchi M, Ohta K, et al	Chemotactic agonists induce cytokine generation in eosinophils	J Immunol	154	1339-1349	1995
Ohta K, Mortenson RL, Clark R A F, Hirose N, King TE	Immunohistochemical identification and characterization of smooth muscle-like cells in idiopathic pulmonary fibrosis	Am J Respir CritMed	152	1659-1665	1995
Yamashita N, Tajima M, Nakano J, Arioka H, Arai H, Miyasaka T, Kubota S, Kawashima R, Ohta K.	Induction of apoptosis in bronchial eosinophils: beneficial or harmful?	Int Arch Allergy Immunol	122 Suppl 1	40-3	2000

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Yamashita N, Koizumi H, Murata M, Mano K, Ohta K.	Nuclear factor kappa B mediates interleukin-8 production in eosinophils	Int Arch Allergy Immunol	120 (3)	230-6	1999
Yamashita N, Takeno M, Kaneko S, Mizushima Y, Sakane T.	Therapeutic effects of preferential induction of mite-specific T helper Oclones	Clin Exp Immunol	109 (2)	332-41	1997
Yamashita N, Kaneko S, Kouro O, Furue M, Yamamoto S, Sakane T.	Soluble E-selectin as a marker of disease activity in atopic dermatitis	J Allergy Clin Immunol	99 (3)	410-6	1997
Goto, H., Kohono, K., Sone, S., Akiyama, H., Kuwano, M., and Ono, M	Interferon γ -dependent induction of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial growth factor through γ -activated sequence-like element in human macrophages.	Cancer Res	61	469-473	2001
Sone, S., Shinohara, T., Nishioka, Y., and Yano, S	Molecular pathogenesis of lung cancer and its molecular targeted therapy.	Internal Med	40 (2)	167-170	2001
Ge, N., Nakamura, Y., Nakaya, Y., and Sone, S	Interferon- γ activates outwardly rectifying chloride channels in the human bronchial epithelial cell line BEAS-2B.	J. Med. Invest.	48	97-101	2001
Nishimura, N., Nishioka, Y., Shinohara, T., and Sone, S	Enhanced efficiency by centrifugal manipulation of adenovirus-mediated interleukin 12 gene transduction into human monocyte-dendritic cells.	Human Gene Therapy	12	333-346	2001
兼松貴則, 大出文隆, 小川博久, 西廣安彦, 篠原勉, 楊河宏章, 曾根三郎	?胞状変化を呈した肺サルコイドーシスの1例	日本呼吸器学会雑誌	39 (2)	117-121	2001
Takeuchi, E., Yanagawa, H., Suzuki, Y., Shinkawa, K., Bando, H., and Sone, S	Interleukin (IL-) 15 has less activity than IL-2 to promote type 2 cytokine predominance in tumour-associated mononuclear cells from lung cancer patients.	Cytokine	13 (2)	119-123	2001
Parajuli, P., Yanagawa, H., Hanibuchi, M., Takeuchi, E., Miki, T., Yano, S., and Sone, S	Humanized anti-ganglioside GM2 antibody is effective to induce antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in mononuclear cells from lung cancer patients.	Cancer Letters	165	179-184	2001
Nishimura, N., Nishioka, Y., Shinohara, T., Ogawa, H., Yamamoto, S., Tani, K., and Sone, S.	Novel centrifugal method for simple and highly efficient adenovirus-mediated green fluorescence protein gene transduction into human monocyte-derived dendritic cells.	J Immunol Methods	253	113-124	2001
Hanibuchi, M., Yano, S., Nishioka, Y., Yanagawa, H., Miki, T., and Sone, S	Immunological circumvention of multiple organ metastases of multidrug resistant human small cell lung cancer cells by mouse-human chimeric anti-ganglioside GM2 antibody KM966.	Clin. Exp. Metastasis	18	353-360	2001
Huang, L., Ogushi, F., Tani, K., Ogawa, H., Kawano, T., Endo, T., Izumi, K., Sono, N., Ueno, J., Nishitani, H., and Sone, S	Thrombin promotes fibroblast proliferation during the early stages of experimental radiation pneumonitis.	Radiation Res	156	45-52	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Nokihara, H., Yano, S., Nishioka, Y., Hanibuchi, M., Higashida, T., Tsuruo, T., and Sone, S	A new quinoline derivative MS-209 reverses multidrug resistance and inhibits multiorgan metastases by p-glycoprotein-expressing human small cell lung cancer cells	Jpn. J. Cancer Res	92	785-792	2001
Ogushi, F., Tani, K., Endo, T., Tada, H., Kawano, T., Asano, T., Huang, L., Ohmoto, Y., Muraguchi, M., Moriguchi, H. and Sone, S.	Autoantibodies to IL-1 α in sera from rapidly progressive idiopathic pulmonary fibrosis.	J. Med. Invest	48	181-189	2001
Tani, K., Ogushi, F., Shimizu, T., and Sone, S.	Protease-induced leukocyte chemotaxis and activation: Roles in host defense and inflammation.	J. Med. Invest	48	133-141	2001
Nishioka, Y., Nishimura, N., Suzuki, Y. and Sone, S	Human monocyte-derived and CD83+ blood dendritic cells enhance NK cell-mediated cytotoxicity.	Eur. J. Immunol	31	2633-2641	2001
Suzuki, Y., Yanagawa, H., Nishioka, Y., Nishimura, N., Takeuchi, E., and Sone, S	Efficient generation of dendritic cells from alveolar and pleural macrophages as well as blood monocytes in patients with lung cancer.	Lung Cancer	34	195-205	2001
Tani, K., Endo, T., and Sone, S.	The Significance of CD13/Aminopeptidase N in Interstitial Lung Diseases.	気管支学	23 (8)	731-734	2001
Takuo Takahashi, Arata Azuma, Shinji Abe, Kunitoshi Ohara and Shoji Kudoh	Significance of Lymphocytosis in Broncho-Alveolar Lavage in Ocular Sarcoidosis Suspects.	Eur Respir J	18	515-521	2001
T. Ishii, T. Matsuse, N. Keicho, S. Teramoto, A. Azuma, S. Kudoh, Y. Fukuchi, and Y. Ouchi.	Association of genetic variation of Gc-globulin with susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and diffuse panbronchiolitis	Eur Respir J	18	753-757	2001
A Azuma	Novel Activity of Erythromycin Derivatives on Inflammatory Lung Diseases	Recent Res. Developments In Respir. & Crit. Care Med. ed. by Pandalai SG, Research Signpost (Trivandrum)	1	191-207	2001
A. Azuma, T Takahashi, S Kudoh, S Henmi, Y Fukuda	The Value and Limitation of Transbronchial Lung Biopsy for the Diagnosis of Diffuse Interstitial Lung Diseases (Excerpta Medica, International Congress Series 1217) Bronchol Bronchoesophageology	State of the Art, ed. by Yoshimura H, Elsevier Science (Netherlands)		107-109	2001
Y. Saito, A. Azuma, S. Kudoh, H. Takizawa and I. Sugawara	Effects of Diesel Exhaust on Murine Alveolar Macrophages and a Macrophage Cell Line	Experimental Lung Research	28	201-217	2002
S Kudoh, A Azuma, J Tamaoki, H Takizawa, H Goto, K Nakata	Chapter 12: Novel Activity of Erythromycin and Its Derivatives	Macrolide Antibiotics, ed. by S Omura, Academic Press (Berlingham, WA)		533-569	2002